

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**(11)Publication number : **2002-356433**(43)Date of publication of application : **13.12.2002**

(51)Int.Cl.

**A61K 31/765****A23K 1/16****A23L 1/30****A61P 37/04****A61P 43/00**(21)Application number : **2001-161756**(71)Applicant : **TENDOU SEIYAKU KK  
TOKAI KYOIKU SANGYO KK**(22)Date of filing : **30.05.2001**(72)Inventor : **TAMAUCHI SHUICHI  
MURAKAMI MASAHIRO  
IWAGAKI SUKETSUNE  
NAGATO YASUKAZU  
MURAYAMA CHIEKO****(54) IMMUNOPOTENTIATOR**

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a new immunopotentiator foods scarcely having adverse effect and foods and beverages for immunopotentiation utilizing the immunopotentiator.**SOLUTION:** This immunopotentiator comprises a cyclic and/or chain polylactic acid mixture having 3-20 condensation degree.**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-356433

(P2002-356433A)

(43) 公開日 平成14年12月13日 (2002. 12. 13)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	予-731-1 <sup>7</sup> (参考)
A 6 1 K 31/765		A 6 1 K 31/765	2 B 1 5 0
A 2 3 K 1/16	3 0 3	A 2 3 K 1/16	3 0 3 E 4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z 4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/04		A 6 1 P 37/04	
43/00	1 0 7	43/00	1 0 7
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁)			

(21) 出願番号 特願2001-161756(P2001-161756)

(22) 出願日 平成13年5月30日 (2001. 5. 30)

(71) 出願人 592066572

天藤製菓株式会社

京都府福知山市佐々木町995番地

(71) 出願人 596031963

京海教育産業株式会社

神奈川県伊勢原市下鶴屋164番地

(72) 発明者 玉内 秀一

神奈川県川崎市麻生区王禅寺西7-1-1

アルス王禅寺315

(72) 発明者 村上 正裕

大阪府大阪市平野区喜連西3-17-6

(74) 代理人 100096219

弁理士 今村 正純 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫賦活剤

(57) 【要約】

【課題】 副作用の少ない新規な免疫賦活剤、並びに上記免疫賦活剤を利用した免疫賦活のための飲食品を提供すること。

【解決手段】 縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸重合体を含む免疫賦活剤。

(2)

特開2002-356433

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を含む免疫賦活剤。

【請求項2】 ナチュラルキラー細胞の活性化のために使用する、請求項1に記載の免疫賦活剤。

【請求項3】 ポリ乳酸中における反復単位である乳酸が実質的にL-乳酸から成る、請求項1又は2に記載の免疫賦活剤。

【請求項4】 縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物が、乳酸を不活性雰囲気下で脱水縮合し、得られた反応液のエタノールおよびメタノール可溶分を逆相カラムクロマトグラフィーに付し、pH2～3の25～50重量%のアセトニトリル水溶液で溶離後、pH2～3の90重量%以上のアセトニトリル水溶液で溶離した画分である、請求項1から3の何れか1項に記載の免疫賦活剤。

【請求項5】 脱水縮合を窒素ガス雰囲気下、段階的減圧及び昇温により行う、請求項4に記載の免疫賦活剤。

【請求項6】 逆相カラムクロマトグラフィーを、ODSカラムクロマトグラフィーにより行う請求項4又は5

【請求項7】 請求項1から6の何れかに記載の免疫賦活剤を含む、免疫賦活のための飲食品。

【請求項8】 請求項1から6の何れかに記載の免疫賦活剤を含む、免疫賦活のための家畜用飼料及び飼料添加物。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、免疫賦活剤に関する。より詳細には、本発明は、例えば、ウイルスやバクテリア等の微生物による感染症や各種悪性腫瘍などの予防や治療に有効な医薬品、特定保健用食品、健康食品等として用いることができる免疫賦活剤に関する。

【0002】

【従来技術】生体内の免疫系は、細菌、酵母、カビ、ウイルスなどの微生物による感染や、腫瘍に対する防御に重要な役割を果たしており、その主要な機構は、Tリンパ球やBリンパ球などの免疫担当細胞がこれらの微生物や腫瘍を抗原受容体を介して認識することにより刺激を受け、抗原特異的に活性化し、これらの異物を排除する能力を高めることである。常に微生物に曝され、また、細胞が変異している生体内では、こうしたTリンパ球およびBリンパ球の活性化は常時起こっている。また、抗原特異的な活性化の他に、Tリンパ球およびBリンパ球の活性化には、菌体成分やレクチン等を認識する受容体を

2

る各種疾患には、例えば癌、各種病原微生物感染症などがあり、これらの疾患を予防もしくは治療する目的でこれまでに種々の免疫増強剤が報告されている。免疫担当細胞を活性化して微生物感染や腫瘍に対する生体の防御機構を高めることを目的として、各種の免疫賦活剤が使用されているが、有効性において満足しうるものは少ない。また、これらの免疫賦活剤の中には、生体にとって好ましくない免疫応答を誘導し、種々のアレルギー反応をはじめとする副作用を引き起こすという問題を伴うものもある。

【0004】一方、食品の開発において、長い間、その一次機能及び二次機能、すなわち栄養的特性および嗜好的特性が研究の二大分野を形成していたが、近年になって、生理機能調節特性と呼ばれる三次機能が見出され、科学的に解明されつつある特定の疾病の予防に役立つ食品として機能性食品が注目されるようになってきた。免疫増強効果を有する機能性食品も幾つか提案されており、今後更なる研究が期待される分野となってきた。

【0005】これまでの研究により、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ-L-乳酸混合物は、抗癌性腫瘍剤として有用であることが報告されている（特開平9-227388号公報および特開平10-130153号公報）。しかしながら、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物が免疫賦活作用を発揮するかどうかの評価については報告されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、副作用の少ない新規な免疫賦活剤を提供することを解決すべき課題とした。本発明はまた、上記免疫賦活剤を利用した免疫賦活のための飲食品を提供することを解決すべき課題とした。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物(CPL)の経口投与による免疫賦活効果の一つとしてマウスにおける末梢でのナチュラルキラー(Natural Killer: NK)細胞活性への増強効果を検討し、CPL経口摂取がナチュラルキラー細胞を活性化することを見出した。さらに、本発明者らは、CPLの腹腔投与によるナチュラルキラー細胞活性への増強効果を検討した結果、一定量以上のCPLの腹腔投与により経口摂取の場合と同様の増強効果が得られることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0008】即ち、本発明によれば、縮合度3～20の

(3)

特開2002-356433

3

縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物は、乳酸を不活性雰囲気下で脱水縮合し、得られた反応液のエタノールおよびメタノール可溶分を逆相カラムクロマトグラフィーに付し、pH2～3の25～50重量%のアセトニトリル水溶液で溶離後、pH2～3の90重量%以上のアセトニトリル水溶液で溶離した画分である。

【0010】好ましくは、脱水縮合を窒素ガス雰囲気下、段階的減圧及び昇温により行う。好ましくは、逆相カラムクロマトグラフィーを、ODSカラムクロマトグラフィーにより行う。本発明の別の側面によれば、上記した本発明の免疫賦活剤を含む、免疫賦活のための飲食品並びに家畜用飼料及び飼料添加物が提供される。

【0011】本発明のさらに別の側面によれば、免疫賦活剤又は免疫賦活のための飲食品の製造における、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物の使用が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物の有効量をヒトなどの哺乳動物に投与することを含む、免疫を賦活するための方法が提供される。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施態様および実施方法について詳細に説明する。本発明の免疫賦活剤は、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を有効成分として含むものである。

【0013】本発明の免疫賦活剤は、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）を活性化することができ、これにより生体の免疫能力を増強させる。なお、本発明でいう免疫賦活とは、生体の有する免疫機能を活性化する効果だけでなく、何らかの理由で生体の免疫機能が低下している場合には、その機能を通常の状態まで回復させる効果をも含むものである。

【0014】ナチュラルキラー細胞（NK細胞）は、腫瘍細胞及びウイルスに対する防御作用を発揮するリンパ球の一種である。NK細胞は、DC56及びDC16マーカーの存在及びDC3マーカーの欠如によって同定することができる。NK細胞は、免疫適合宿主又は免疫抑制された宿主において抗原非特異的抗腫瘍免疫に関与し、原発性腫瘍や転移性腫瘍の発生の防止に寄与している。このようにNK細胞は抗原非特異的細胞傷害活性を有するため、エフェクター細胞として養子免疫に用いることも可能である。本発明の免疫賦活剤はナチュラルキラー細胞を活性化することができるので、これにより腫瘍細胞やウイルスに対する防御作用を発揮することができる。

4

【0016】本発明の免疫賦活剤は、感染やストレスなどによる生体の免疫能力の低下に基づくと考えられる各種疾患を予防するために使用することができ、例えば、病原性細菌やウイルスの感染防御や癌の予防などを目的として使用することができる。より具体的には、本発明の免疫賦活剤は、哺乳動物（例えば、マウス、ネコ、イヌ、牛、馬、羊、山羊、家兎、ヒトなど）に対して免疫賦活作用を発揮し、ナチュラルキラー細胞の活性化により、各種ウイルス感染症や腫瘍の治療または予防に有用である。例えば、本発明の免疫賦活剤を腫瘍を保持する哺乳動物に投与することにより、延命効果を発揮することができる場合がある。本発明の免疫賦活剤を用いることができる対象疾患としては、各種白血病、悪性リンパ腫、骨肉腫、悪性黒色腫、悪性絨毛上皮、筋肉腫、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、肺癌、胃ならびに腸などの消化器癌、肺癌、食道癌、頸頭部腫瘍、脳腫瘍、肝癌などのウイルス性腫瘍などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0017】本発明の免疫賦活剤を病原性細菌やウイルスの感染などに先立って予め摂取しておくこと、感染しにくく、また、感染しても治りやすいという予防的作用を有する。従って、本発明の免疫賦活剤は、健康食品や医薬品として日頃から摂取しておくことも好ましい。

【0018】本発明の免疫賦活剤及び免疫賦活のための飲食品においては、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物が有効成分として用いられる。本明細書で言う「ポリ乳酸混合物」とは、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸が任意の割合で存在する混合物を意味する。即ち、「混合物」という用語は、縮合度3～20の何れかを有するポリ乳酸の混合物であることを意味すると同時に、環状および鎖状のポリ乳酸の混合物を含む概念としても用いられる。このような「ポリ乳酸混合物」は、本明細書中以下に述べるように、乳酸を脱水縮合し、適当な方法で精製することにより得ることができる。なお、本明細書では便宜上「ポリ乳酸混合物」という用語を用いたが、この中には一定の縮合度を有する環状のポリ乳酸または一定の縮合度を有する鎖状のポリ乳酸といった単一成分から成るポリ乳酸も含まれる。縮合度とは、ポリ乳酸中における反復単位である乳酸単位の数を意味する。例えば、環状のポリ乳酸は下記の構造式を有することが推測されるが、式中のnが縮合度を表す（即ち、 $n = 3 \sim 20$ ）。

【0019】

【化1】

(4)

特開2002-356433

5

【0020】本明細書で単に「乳酸」と称する場合、この乳酸にはL-乳酸、D-乳酸またはこれらの任意の割合の混合物の全てが含まれる。本発明においては好ましくは、乳酸は実質的にL-乳酸から成る。ここで言う「実質的に」とは、ポリ乳酸混合物中におけるL-乳酸単位の比率【即ち、 $(L\text{-乳酸単位数}/L\text{-乳酸単位数} + D\text{-乳酸単位数}) \times 100$ 】が、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上であることを意味する。なお、ポリ乳酸混合物中におけるL-乳酸単位の比率は、出発物質として使用する乳酸中に存在するL-乳酸とD-乳酸の比率に依存する。

【0021】縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物の製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、特開平9-227388号公報、特開平10-130153号公報、または特開平11-39894号明細書（これらの特許明細書に記載の内容は全て引用により本明細書の開示として含める。）などに記載の製造方法により得ることができる。より具体的には、例えば、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物は、下記の方法Aにより得ることができる。

【0022】方法A：まず、乳酸（好ましくは、実質的にL-乳酸から成る乳酸）を不活性雰囲気下で脱水縮合させる。不活性雰囲気としては、例えば、窒素ガス、アルゴンガスなどが挙げられるが、窒素ガスを用いるのが好ましい。脱水縮合反応は、常圧～1 mmHg程度の減圧下、110～210℃、好ましくは130～190℃の温度で行われるが、段階的減圧および段階的昇温によって行うのが特に好ましい。反応時間は適宜設定できるが、例えば1～20時間反応を行うことができる。段階的減圧および段階的昇温を用いる場合には、反応時間を2以上から成る部分的な反応時間に分け、それぞれの部分において圧力と温度を設定して反応を行う。段階的減圧を用いる場合は、例えば、常圧→150 mmHg→3 mmHgと減圧することができ、段階的昇温を用いる場合は、例えば、145℃→155℃→185℃と昇温することができる。実際には、これらを組み合わせて、例えば、145℃で常圧で3時間、145℃で150 mmHgで3時間、155℃で3 mmHgで3時間そして185℃で3 mmHgで1.5時間反応を行うことができる。

【0023】次いで、この脱水縮合反応により得られた反応混合物にエタノールおよびメタノールを加え、濾過して濾液を乾燥してエタノールおよびメタノール可溶分が得られる。即ち、本明細書で言う「エタノールおよび

6

でき、例えばエタノール：メタノール＝1：9である。なお、反応混合物にエタノールとメタノールを添加する順番、方法などは限定されず、適宜選択することができ、例えば、脱水縮合反応の反応混合物に先ずエタノールを添加し、次いでメタノールを添加することができる。

【0024】上記で得られたエタノール・メタノール可溶分を逆相カラムクロマトグラフィー、特にオクタデシルシラン（ODS）カラムを用いたクロマトグラフィーに付し、まずpH2～3の25～50重量%のアセトニトリル水溶液で溶離する画分を除去し、次いでpH2～3の90重量%以上のアセトニトリル水溶液、好ましくは99重量%以上のアセトニトリル水溶液で溶離してくる画分を採取すると、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物が得られる。上記のようにして得られた環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物は、水酸化ナトリウムなどのアルカリ物質で中和し、減圧乾燥後、適法により下記に述べるような所望の形態に製剤化することができる。

【0025】本発明で用いる縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を製造するための別法としては、例えば、特開平11-265715号明細書に記載された方法（方法Bとする）または特開平11-265732号明細書に記載された方法（方法Cとする）を挙げることができる（これらの特許明細書に記載の内容は全て引用により本明細書の開示として含める。）。以下、方法Bおよび方法Cについて具体的に説明する。

【0026】方法B：この方法は、ラクチドをRYL<sub>1</sub>（式中、Rは脂肪族基又は芳香族基を示し、Yは酸素原子又はイオウ原子を示す）で表されるリチウム化合物の存在下で重合させることによって環状乳酸オリゴマーを製造する方法である。重合反応を実施する場合、リチウム化合物（RYL<sub>1</sub>）の使用割合は、ラクチド1モル当たり、1～0.1モル、好ましくは0.2～0.3モルの割合である。反応温度は-100～0℃、好ましくは-78～-50℃である。反応は、-78～-50℃の温度で開始し、徐々に室温にまで昇温させるように実施するのが好ましい。反応は、好ましくは反応溶媒の存在下で実施される。反応溶媒としては、テトラヒドロフラン等の環状エーテルの他、ジエチルエーテル、ジメトキシエタン等を用いることができる。反応雰囲気としては、窒素ガスやアルゴン等の不活性ガス雰囲気が用いられる。反応圧力は特に制約されず、好ましくは常圧である。

【0027】なお、上記のようにして得られる乳酸オリ

(5)

特開2002-356433

7

る場合には、環状乳酸オリゴマーと鎖状オリゴマーとの混合物（環状乳酸オリゴマーの割合：80～85重量%）が得られる。一方、リチウム化合物として $\alpha$ -ブチルアルコール等の炭素数4以上のアルキルアルコールのリチウム化合物や、チオフェノール化合物を用いるときには、実質的に環状乳酸オリゴマーのみを選択的に得ることができる。

【0028】方法C：この方法は、(i) 乳酸を350～400 mmHgの圧力条件で120～140℃の範囲の温度に加熱し、脱水縮合反応させるとともに、ラクチドを留出させずに副生水のみを留出除去する第1加熱工程、(ii) 該第1加熱工程終了後、反応生成物を150～160℃の温度に加熱し、該反応圧力を降圧速度0.5～1 mmHg/分で15～20 mmHgまで降下させるとともに、その降圧に際し、ラクチドの留出を回避させながら副生水のみを留出除去し、該反応圧力が15～20 mmHgに降下後、同圧力条件及び反応温度150～160℃においてさらに反応を継続して鎖状乳酸オリゴマーを主成分とする脱水縮合物を生成させる第2加熱工程、(iii) 該第2加熱工程終了後、0.1～3 mmHgの圧力条件で150～160℃で加熱して該鎖状乳酸オリゴマーを環化させ、環状オリゴマーを生成させる第3加熱工程、からなることを特徴とする方法である。

【0029】この方法ではまず、第1加熱工程において、減圧下において乳酸を加熱し、脱水縮合反応させる。この場合の反応時間は3～12時間、好ましくは5～6時間である。この第1加熱下での反応は、その反応を円滑に進行させるために、乳酸の脱水縮合により生成する副生水を留去させるが、この場合、乳酸2分子の脱水縮合であるラクチドが留去しないように実施する。このためには、反応圧力を減圧、好ましくは300～500 mmHg、より好ましくは350～400 mmHgに保持し、この圧力条件下において、100～140℃、好ましくは130～140℃の範囲に加熱するのがよい。この第1加熱工程での反応により、主に、乳酸の3～23分子の脱水縮合物を主成分とする反応生成物が生じる。

【0030】上記第1加熱工程の終了後、第2加熱工程において、高められた平均重合度のオリゴマーが得られるように、前記第1加熱工程における反応温度よりも高められた温度、好ましくは145～180℃、より好ましくは150～160℃の温度に加熱するとともに、反応圧力を10～50 mmHg、好ましくは15～20 mmHgの圧力に降下させてさらに脱水縮合反応を継続す

8

度）は、ラクチドの留出を回避し、且つ反応効率を高めるためには、0.25～5 mmHg/分、好ましくは0.5～1 mmHg/分の範囲に保持することが通常は必要である。前記範囲より低い降圧速度では、その所定圧まで降圧させるのに必要な時間が長くなるため好ましくなく、一方、前記範囲より高い降圧速度では、ラクチドが副生水とともに留去するようになるので好ましくない。

【0032】反応圧力が所定圧力にまで降下後、この反応圧力において、さらに反応を継続する。この場合の加熱時間は、3～12時間、好ましくは5～6時間である。前記第2加熱工程での反応により、平均重合度が3～30、好ましくは3～23の乳酸オリゴマーが得られるが、この場合のオリゴマー中の環状オリゴマーの割合は、通常、70～80重量%程度である。

【0033】上記第2加熱工程終了後、第3加熱工程において、反応圧力を0.25～5 mmHg、好ましくは0.5～1 mmHgに保持し、145～180℃、好ましくは150～160℃の温度でさらに反応を継続する。反応時間は3～12時間、好ましくは5～6時間である。この場合に生じる副生水も留去させる。この場合、ラクチドの留去も回避させることが好ましいが、反応生成物にはラクチドは殆んど含まれないので、その降圧速度を格別遅くする必要はない。前記第3加熱工程での反応により、平均重合度3～30、好ましくは3～23で、かつ環状オリゴマーの割合が90重量%以上、好ましくは99重量%以上の乳酸オリゴマーが生成される。なお、上記方法A、BおよびCは本発明で用いるポリ乳酸混合物の製造方法の具体例の一部を示したものにすぎず、本発明においては他の方法で製造されたポリ乳酸混合物を用いることもできる。

【0034】本発明の免疫賦活剤は、他の化学療法剤および/または他の免疫療法剤と併用することもできる。他の化学療法剤としては、マイトマイシン、アドリアマイシン、シスプラチン、ビンデシン、ビンクリスチン、サイクロフォスファミド、イフォマファミド、プレオマイシン、ペブレオマイシンもしくはエトポシドのような抗癌剤が挙げられる。また他の免疫療法剤としては、微生物もしくは細菌細胞壁骨核成分；免疫活性多糖天然型もしくは遺伝子工学手法で得られるサイトカイン；またはコロニー刺激因子のようなものが挙げられ、上記免疫活性多糖としてはレンチナンもしくはシゾフィラン等が、細菌細胞壁骨核成分としてはムラミルジペプチド誘導体等が、微生物としては乳酸菌等が、また天然型もしくは遺伝子工学手法で得られるサイトカインとしてはイ

9

る。本発明の免疫賦活剤は、単独の医薬品類として使用できる以外に、医薬品類や医薬部外品類などに配合して用いることもできる。また、本発明の免疫賦活剤は他の機能性食品と一緒に配合にて用いたり、併用することができる。

【0036】本発明の免疫賦活剤の形態は特に限定されず、経口投与又は非経口投与用の製剤形態の中から目的に最も適した適宜の形態のものを選択することが可能である。経口投与に適した製剤形態としては、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、ドリンク剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤、溶液剤、乳剤、懸濁剤、チュアブル剤などを挙げることができ、非経口投与に適する製剤形態としては、例えば、注射剤（皮下注射、筋肉内注射、又は静脈内注射など）、外用剤、点滴剤、吸入剤、噴霧剤などが挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0037】経口投与に適当な液体製剤、例えば、溶液剤、乳剤、又はシロップ剤などは、水、ショ糖、ソルビット、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを用いて製造することができる。また、カプセル剤、錠剤、散剤、又は顆粒剤などの固体制剤の製造には、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニットなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いることができる。

【0038】非経口投与に適当な注射用又は点滴用の製剤は、好ましくは、受容者の血液と等張な滅菌水性媒体に有効成分である上記の物質を溶解又は懸濁状態で含んでいる。例えば、注射剤の場合、塩溶液、ブドウ糖溶液、又は塩水とブドウ糖溶液との混合物からなる水性媒体などを用いて溶液を調製することができる。腸内投与のための製剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪、又は水素化カルボン酸などの担体を用いて調製することができる。座剤として提供される。また、噴霧剤の製造には、有効成分である上記の物質を微細な粒子として分散させることができ、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ有効成分の吸収を容易ならしめる担体を用いることができる。担体としては、具体的には、乳糖又はグリセリンなどが例示される。有効成分である物質及び使用する担体の性質に応じて、エアロゾル又はドライパウ

(6)

特開2002-356433

10

【0039】本発明の免疫賦活剤の投与量及び投与回数、投与の目的、投与形態、摂取者の年齢、体重又は性別などの条件などを含む種々の要因により適宜設定することができるが、一般的には、有効成分の投与量として一日当たり1~10,000mg/kg、好ましくは10~2000mg/kg、より好ましくは10~200mg/kgである。上記投与量の製剤を一日1~4回程度に分けて投与することが好ましい。本発明の免疫賦活剤の投与時期は特に限定されず、微生物感染の前でも後でもよい。

【0040】本発明はさらに、縮合度3~20の環状及び/又は鎖状のポリ乳酸混合物を含む免疫賦活のための飲食品にも関する。即ち、本発明で用いる縮合度3~20の環状及び/又は鎖状のポリ乳酸混合物は、上記したような単独の製剤の形態で使用するのみならず、飲食品の中に配合して用いることができる。本発明の免疫賦活のための飲食品は、ポリ乳酸混合物を分解させることなく配合し得るものであれば、その配合形態には特に制限はない。

【0041】本発明による免疫賦活のための飲食品の製品的具体例としては、清涼飲料、ドリンク剤、健康食品、特定保健用食品、機能性食品、機能活性型食品、栄養補助食品、サプリメント、飼料、飼料添加物など一般に呼称される、飲料を含む健康食品または補助食品が挙げられる。また、本発明の免疫賦活剤は、獣医薬、餌飼料、家畜用飼料及び飼料添加物等として用いることもできる。

【0042】飲食品的具体例としては、例えば、チューインガム、チョコレート、キャンディー、錠菓、ゼリー、クッキー、ビスケット、ヨーグルト等の菓子類、アイスクリーム、氷菓等の冷菓類、茶、清涼飲料（ジュース、コーヒー、ココア等を含む）、栄養ドリンク剤、美容ドリンク剤等の飲料、パン、ハム、スープ、ジャム、スパゲティー、冷凍食品など任意の飲食品を挙げることができる。あるいは、本発明で用いるポリ乳酸混合物は調味料又は食品添加剤などに添加して用いることもできる。本発明の免疫賦活のための飲食品を摂取することにより免疫賦活効果が発揮され、実質的に有害な副作用を示さない安全な飲食品を提供することができる。本発明の免疫賦活のための飲食品は、ポリ乳酸混合物を、食品に使われる一般的な原料に直接混合、分散したのち、公知の方法により所望の形態に加工することによって得ることができる。

【0043】本発明の免疫賦活のための飲食品はあらゆる形態の飲食品を包含するものであり、その種類は特に

(7)

特開2002-356433

11

他に、蛋白質、脂質、糖質、ビタミン及び／又はミネラル類などを含めることができる。飲食品の形態は特に限定されず、摂取しやすい形態であれば、固形、粉末、液体、ゲル状、スラリー状等のいずれであってもよい。

【0044】飲食品中におけるポリ乳酸混合物の含有量は特に限定されないが、一般的には0.1～20重量％、より好ましくは0.1～10重量％程度である。飲食品に含まれるポリ乳酸混合物の量は、本発明の目的とする免疫賦活作用を発揮できる程度に含まれることが好ましく、好ましくは摂取される飲食物1食中に0.1gから10g程度、より好ましくは0.5gから3g程度である。以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によっていかなる点においても限定されることはない。

【0045】

【実施例1】製造例1：ポリ乳酸混合物（以下、CPLとも称する）の製造

マントルヒーターに収めたセパラブルフラスコにL-乳酸（D-乳酸も混入しているもの）500mlを入れ、窒素ガス300ml/分の流入及び攪拌を行い、溜出水は保温した下降型接続管を経て還流冷却器付フラスコに導きながら、145℃で3時間加熱した。更に150mmHgに減圧して同温度で3時間加熱した後、3mmHgの減圧下155℃で3時間、最後に3mmHgの減圧下185℃で1.5時間加熱し、反応生成物であるポリ乳酸を得た。得られたポリ乳酸は100℃に保ち、エタノール100mlに続いてメタノール400mlをそれぞれ加えた後放冷した。これをメタノール500ml中に加え、よく攪拌して静置した後濾過して精製した。その濾液を減圧乾燥してアセトニトリルに溶解し、全量を200ml（原液）とした。

【0046】この原液を、予め平衡化した逆相ODSカラム（TSK gel ODS-80TM）にかけ、0.01M塩酸を含む30％、50％および100％アセトニトリル（pH2.0）でステップワイズに溶離し、アセトニトリル100％溶出画分であるポリ乳酸（縮合度3～20）を得た。得られた物質の質量スペクトルを図1に示す。図1中の規則的なフラグメントイオンピークから明らかに、得られたポリ乳酸の混合物は、環状縮合体を主体とし、直鎖状縮合体が少量混在した状態になっている。

【0047】試験例1：試験例1では、環状ポリ乳酸（CPL）の経口摂取による生体免疫反応、特に抗腫瘍活性を示すエフェクター細胞の一つであるナチュラルキラー（Natural Killer: NK）の活性について検討を加

12

ンパ球（Intraepithelial lymphocytes: IEL）は常法に従って分離後、Precollにて精製したものをを用いた。NK活性は、その標的細胞であるリンホマ（YAC-1）を<sup>51</sup>Crナトリウム溶液で標識し、エフェクター細胞と100:1、50:1、25:1の割合で混ぜて37℃、CO<sub>2</sub>インキュベーターにて4時間反応後の培養上清中の放射活性をγカウンターで測定して細胞障害活性を算出した。また、サイトカインの検出は、細胞内サイトカイン染色を用い、分離した細胞をBrefeldinで4～6時間処理した後、リンパ球表面抗原（CD4もしくはCD8）に対する抗体で染色し、パラホルムアルデヒド溶液で固定後サポニンで細胞膜に穴を開けて蛍光標識抗サイトカイン抗体にて染色を行い、自動細胞分析装置（FACSscan）にて二次元解析を行った。

【0048】（結果および考察）CPLの自然経口摂取によって、脾臓中のNK活性が、未摂取群の活性値に対して30～40％増強された。0.1％と1.0％摂取群の間では差は認められず共に同程度のNK活性を示した。Lymphokine activated killer（LAK）活性は、認められなかった。細胞数に変化は認められなかった。また、サイトカインの産生を細胞内染色で見た場合、CD8+IL-2+細胞が、未摂取群の約2～5倍増加していた。IELに関しては、軽度のNK活性が認められ、細胞数の変化は認められなかった。以上のことより、CPLの経口摂取は腸管および脾臓中のNK活性を増強することが明らかになった。

【0049】試験例2：試験例2では、腹腔内投与によるNK活性の増強効果について検討した。

【0050】（材料および方法）6週令雌C57BL/6マウスの腹腔にCPL4mg/mouseの濃度で隔日で10回投与した。最終投与2日後に脾臓を摘出し細胞浮遊液にして、NK活性は、YAC-1、LAK活性はRDM4を<sup>51</sup>Crナトリウム溶液で標識し、エフェクター細胞と標的細胞を100:1、50:1、25:1の割合で混ぜて37℃、CO<sub>2</sub>インキュベーターにて4時間反応後の培養上清中の放射活性をγカウンターで測定して細胞障害活性を算出した。また、CPLの最終投与濃度がその半量であるマウスについても同様に検討を加えた。

【0051】（結果および考察）

（1）図2に、CPL腹腔投与によるC57BL/6マウス脾臓の細胞数とNK活性およびLAK活性の検討の結果を示す。6週令雌マウスに1回4mgのCPLを隔日に投与し、最終投与2日後に脾臓を摘出して細胞数とNKおよびLAK活性を測定した。



(8)

特開2002-356433

13

非感受性)を標的細胞として $^{51}\text{Cr}$ -release法にて測定した。図2の結果から分かるように、総投与量40mgのCPLの腹腔投与において脾細胞数は対照群(通常食)と差は認められなかった。しかし、NK活性およびLAK活性は対照群に対して約2倍高い値を示した。また、20mg CPL腹腔投与においては細胞数の変化およびNK活性、LAK活性ともに増強は認められなかった。

【0052】以上の結果、総量40mg CPLの腹腔投与により、マウス脾臓中のNK・LAK活性を増強することが明らかになった。その増強効果は経口摂取の場合と同様約2倍の効果であった。

【0053】試験例3：本試験では運動選手にCPLを投与した。CPL投与群(n=10)と対照群(n=10)に分け、夏期合宿期間(60日)とその後30日間を中心に、NK細胞数について検討した。CPL投与群では、1日当たり10gの量のCPLを60日間に渡り摂取させた。ALTRA-EPICSを用いて、CD56によるNK細胞(%)を表示した。図3はその結果を示す。CPL投与により、NK細胞の有意な増加が認め

\*られた。

【0054】

【発明の効果】本発明の免疫賦活剤は、ナチュラルキラー細胞を活性化して、生体の免疫機能を増強させることができる。従って、本発明の免疫賦活剤又はこれを添加した飲食品を摂取することによって、感染やストレスなどによる生体の免疫能力の低下に基づくと考えられる各種疾患を予防することができる。また、本発明において有効成分として用いられるポリ乳酸混合物は、生体成分に由来する乳酸の低縮合体であることから、生体適合性が高く、副作用が少ない。

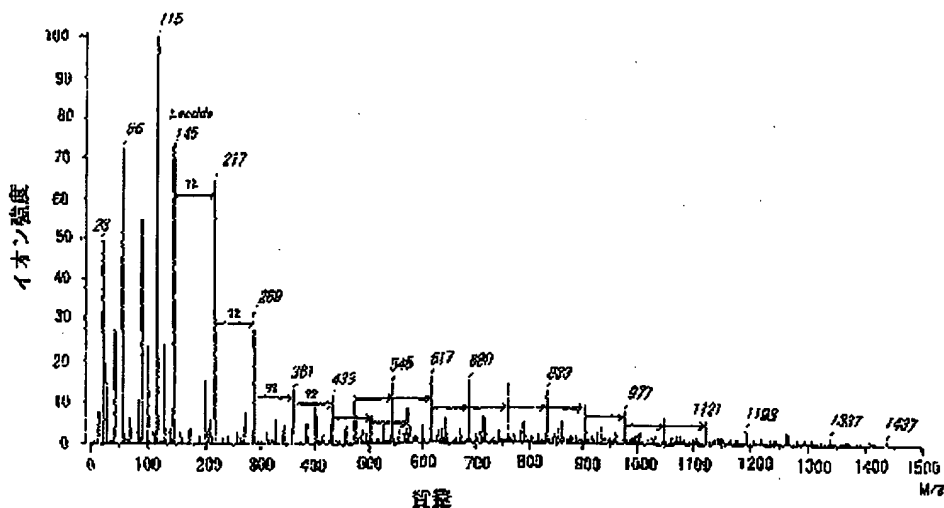
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、製造例1で得られたポリ乳酸混合物の質量スペクトルを示す。

【図2】図2は、CPL腹腔投与によるC57BL/6マウス脾臓の細胞数とNK活性およびLAK活性の検討の結果を示す。

【図3】図3は、CD56によるNK細胞の比率(%)を示す図である。

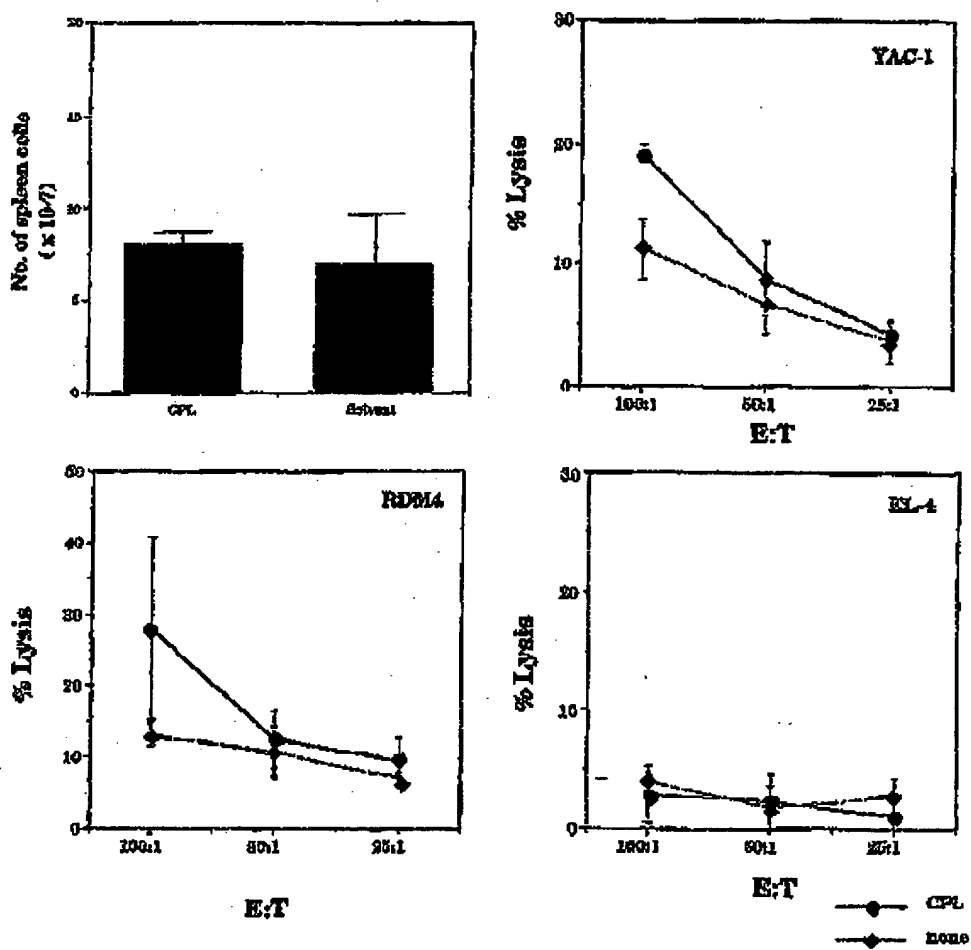
【図1】



(9)

特開2002-356433

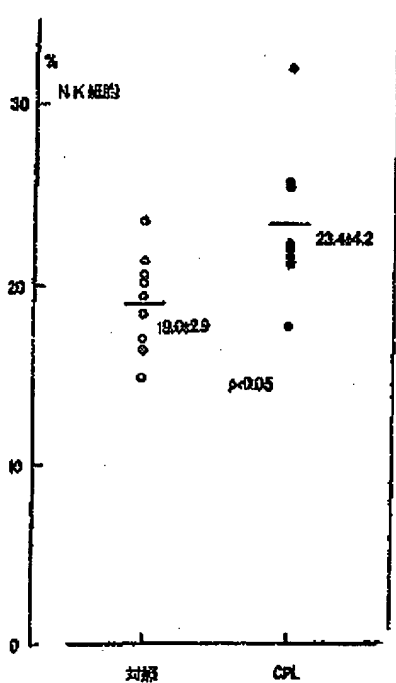
【図2】



(10)

特開2002-356433

【図3】



CD56 による NK 細胞 (%)

フロントページの続き

(72)発明者 岩垣 丞恒  
 神奈川県秦野市京田原497-6  
 (72)発明者 長戸 康和  
 神奈川県厚木市森の里2-20-12  
 (72)発明者 村山 千恵子  
 神奈川県海老名市上今泉5-38-1

F ターム(参考) ZB150 AA01 AA02 AA06 AA20 AB03  
 AB10 AB20  
 4B018 LE01 MD09 ME08 ME10  
 4C086 AA01 AA02 FA02 MA01 MA04  
 NA14 ZB09 ZB22 ZC75

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**